イヌα-フェトプロテイン抗原 EIA キット

カタログ No. PG-CAFPEIA

Prop C-EIA（96 テスト）

[推奨される使用方法]

このイムノアッセイキットはイヌの血清または血漿を用いて、イヌのα-フェトプロテイン（AFP）タンパクを特異的に定量測定するキットです。

[全般的な注意]

・診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断してください。
・測定は必ず添付文書記載の操作通りに実施してください。添付文書以外の使用方法で得られた結果については、保証できません。
・測定に使用する機器の取扱説明書をよく読んでから使用してください。

[形状・キット構成]

①抗体結合プレート・・・96 ウェル x 1 枚
②標準溶液・・・1 チューブ（50μL、100U/mL） x 1 本
③PBST（Tween 含有リン酸緩衝液）・・・200mL x 1 本
④1 次抗体（抗イヌ AFP-ウサギ血清溶液）・・・10mL x 1 本
⑤2 次抗体（HRP 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体）・・・10mL x 1 本
⑥基質溶液（過酸化水素含む）・・・10mL x 1 本
⑦基質・・・オルトフェニレンジアミン（OPD）・・・10mg x 1 本
⑧反応停止液（2N-硫酸）・・・10mL x 1 本

[使用目的]

イヌ結清または血漿中のαフェトプロテイン（AFP）の EIA 法による測定

[測定原理]

本キットはマイクロプレートのウェルに結合した抗 AFP モノクローナル抗体(抗体結合プレート)と 1 次抗体（抗イヌ AFP 抗体（兎））および 2 次抗体（HRP 標識抗兎抗体（ヤギ））とを組み合わせた、酵素免疫測定を原理とするイヌ血中 AFP 測定用キットです。

[操作上の注意]

１．測定試料および採取方法

（１） 検体としてイヌの血清または血漿を用います。

（２） 試料を血漿として採取する場合は、抗凝固剤としてヘパリン、EDTA,クエン酸等を用いることができます。
（３） 検体を長期間保存する場合は凍結してください（凍結保存で少なくとも 3 カ月間は安定)。凍結した検体を使用する場合には、室温で序々に融解し、使用前によく混和してください。

２．測定に影響を与える因子
（１） 妨害物質：溶血はヘモグロビン 1,500ｍｇ/ｄL まで、黄疸血はビリルビン 40ｍｇ/ｄL まで測定結果に影響を及ぼしません。
（２） 妨害薬剤については特に知られていません。
（３） 他の腫瘍マーカーとの交差反応性について、ヒト AFP に対する考査反応は１％未満です。その他のヒト腫瘍マーカーおよびイヌ腫瘍マーカーとの交差反応は認められません。
（４） 異常血清の影響：自己免疫疾患患者の検体は非特異的反応が起こりうるので、診断は他の検査や臨床症状等を考慮して総合的に判断してください。

３．操作法に関する注意
（１）操作開始前に試薬および検体は、操作を行う室内温度に戻しておいてください。
（２）標準溶液および検体は原則として二重測定を行ってください。
（３）ウェル間のコンタミネーションを防ぐため、液の泡立ちや周囲への付着が起こらないよう注意してください。
（４）検体や試薬は微生物汚染や試薬間のコンタミネーションから避けるように注意してください。

[用法・用量]
1． 準備する器具・装置
ピペット、マルチチャンネルピペット、マイクロプレートミキサー、プレートウォッシャー（オプション)、マイクロプレートリーダー、ペーパータオル
２．試薬の調製
（１）標準希釈液の調製
新しく用意したマイクロチューブ 6 本の各々に PBST を 20μL ずつ分注します。標準溶液（100U/mL）の 5μL をとり、その１本目のチューブに分注し、よく混和します（5 倍希釈液の調整)。この 5 倍希釈液からさらに 5μL をとり、2 本目のチューブに加えよく混和します（25 倍希釈液の調整)。同様な操作を 3～6 番目のチューブについて行い、20、4、0.8、0.16、0.032 および 0.0064U/mL の希釈系列を完成します。
（２）抗体結合プレートの準備

抗体結合プレートを開封後、PBST で 3 回洗浄して、アッセイに用います。もし、全てのウェルを使用しない場合には、カバーシールの一部のみハサミで切除して、使用すれば、残りを別の機会に使用できます。

（3）基質溶液の調製

基質溶液全量に OPD 粉末全量を加え、よく混和して完全に溶解させます（完全に溶けるまで数分かかります)。プレートウェルの一部のみを使用する場合にはそれに応じて、混和する量を定めます。混和した溶液は 1 時間以内に使い切るようにしてください。

３．操作法

（1） 抗体結合プレートを PBST、150μL で三回洗浄後、全ウェルに PBST を 90μL ずつ分注します。

（2） 標準曲線用各ウェルに標準希釈液を 10μL ずつ duplicate で加え、同様に検体用ウェルに、被検検体(血清または血漿)10μL ずつを加えます(1 検体で 2 ウェル使用)。その後 37℃で 30 分インキュベートします。

（3） 反応液を除去し、プレートウォッシャーを用いて（あるいはペーパータオルにマイクロプレートをたたいてよく水切りをし)、各ウェルに PBST を加えて洗浄します。この操作を三回繰り返します。

（4） 一次抗体 100μL を全ウェルに加え、軽く攪拌し、37℃で 30 分インキュベートし、その後（3）と同様に PBST で 3 回洗浄します。

（5） 二次抗体 100μL を各ウェルに加え、37℃で 30 分インキュベートします。その後（3）の操作を繰り返します。

（6） 各ウェルに基質溶液 100μL を加え、37℃で 30 分間静置して反応させます。

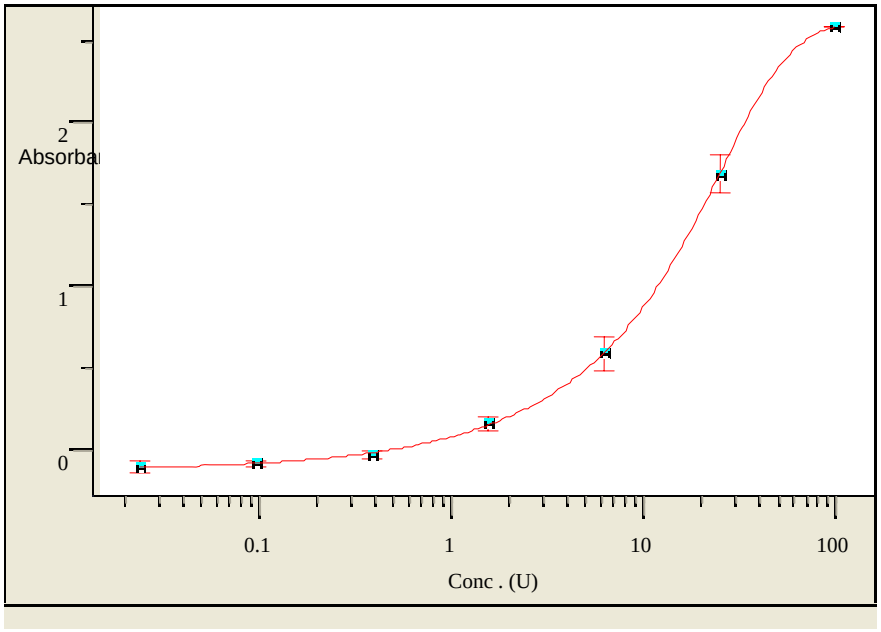
（7） 反応終了後、各ウェルに反応停止液 100μL を加えます。

（8） 490nm における吸光度を測定します（呈色は室温、遮光下で 2 時間は安定)。

４．標準曲線の作成と血中 AFP 濃度の測定

（1）横軸に標準溶液の AFP 濃度を（対数)、また縦軸に吸光度をとり（正規)、片対数グラフを作成します。この標準曲線より検体の AFP 濃度を読み取ります。

（2）標準曲線の例



５．開発の経緯および臨床的意義

近年、わが国では少子高齢化の傾向が進み、ペットを飼う家庭が増えています。ペットの中でもイヌは最も人気があり、またペットの高齢化やそれに伴うがんや生活習慣病もヒトと同じく問題化しています。AFP については、ヒトと同様にイヌの肝細胞性がんにおいて高値が認められ、腫瘍マーカーとしての重要性が指摘されています。しかし、AFP のタンパク構造はイヌとヒトでは､そのアミノ酸構造に差があり、ヒトの測定試薬の抗体では、イヌ AFP タンパクを十分に認識できず、信頼性を欠いていました。そこでイヌ AFP 測定用に開発された本キットはヒト AFP と交差性を有しない､イヌ AFP のみを特異的に認識できる抗体を用いています。

[性能]

１．感度

標準溶液 0.006、0.032、0.16、0.8、4、20 および 100（U/mL）を測定するとき、次の①および②に適合します。

２．正確性

AFP 濃度が 0.5～50U/mL の範囲にある既知濃度の管理用血清を測定するとき、測定値は既知濃度の 85～115%の範囲内にあります。

３．再現性

同一検体を 10 回同時に測定するとき、吸光度の変動係数（C.V.）は 10%以下です。

４．測定範囲

測定濃度範囲は AFP 0.1～100U/mL です。

[取扱い上の注意など]

１．取扱い上（危険防止）の注意

（１）ウイルス

試料は HIV、HBV、HCV の感染の恐れがあるものとして取り扱います。本キットの標準試薬は、イヌ AFP のペプチド配列を含むが、臨床検体同様に注意して取り扱います。検査に使用した検体、各試薬、全ての器具・用具類は次のいずれかの方法で処理します。

① 3% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）にて 5 分間、100℃で処理

② 132℃で一時間オートクレーブにて高圧滅菌

③ 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液にて一時間室温で浸漬

④ 1～5W/V%次亜塩素酸ナトリウムに２時間、室温で浸漬

（２）ピペッティング

検査に使用する各試薬、検体についてピペット操作を行う場合は、いかなる場合も口で吸わないでください。

（３）標準のキャップを開封する際には手指を傷つける恐れがあるので注意してください。

（４）試薬が誤って目や口に入った場合は、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要あれば医師の手当て等を受けてください。

２．使用上の注意

（１）使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。

（２）試薬は必ず同一ロットのものを使用し、他のロットのものと組み合わせて使用しないでください。

（３）開封前の全試薬、調製後の標準溶液以外の試薬を、誤って凍結させた場合は使用しないでください。

３．廃棄上の注意

測定終了後の廃液は、前記 1．(1)ウイルスの項に従って処理した後、十分量の水と共に廃棄してください。

[貯蔵方法・有効期間]

貯法：凍結を避け冷所（4℃）に保存してください。

有効期間：１年

[包装]

イヌα－フェトプロテイン　EIA 測定キット（96 回用）

[主要文献]

1. Madsen AC et al.: J Surg Res 28:71-76, 1980
2. Lowseth LA et al.: J Am Vet Med assoc 199: 735-741, 1991.

以上